

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620110153970

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

利用 TALEN 技术构建 *Mkl* 敲除小鼠以及 MLKL 在坏死样
凋亡中的作用研究

Generation of *Mkl* knock-out mice by TALEN and the role
of MLKL in necroptosis

吴剑锋

指导教师姓名: 韩家淮教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2014 年 11 月

论文答辩时间: 2014 年 12 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 11 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

基因工程小鼠在生命科学研究中发挥着重要作用，尤其是对于阐述和理解基因的生理学功能更是至关重要的。随着基因组测序的迅猛发展，对基因工程小鼠的需求日益增加，但是传统的基于胚胎干细胞中同源重组原理制备基因工程小鼠的技术策略已经无法满足这种需求。因此，发展一种快速、便捷地制备基因工程小鼠的技术成为当代生命科学研究领域的一个重要问题。

转录样激活因子核酸酶（TALEN）技术是近年来发展起来的一种新型基因组编辑技术，在各种细胞中均可以实现对基因组任意 DNA 序列的靶向编辑。但是，对于其是否可以用于基因工程小鼠的制备仍然缺乏相应研究。

坏死样凋亡（Necroptosis）是一种在多种病理生理过程中都发挥重要作用的程序性坏死，混合系蛋白激酶样结构域蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein,MLKL)最近被鉴定为其中的关键蛋白。为了证实 MLKL 在程序性坏死的关键作用，同时探究程序性坏死在败血症病理进程中作用。我们利用 TALEN 技术成功制备了 *Mlkl* 敲除小鼠，证明了 MLKL 确实是程序性坏死过程中所必需的。我们同时还证明了阻断程序性坏死并不能减弱败血症病理进程。

我们的工作不仅证明了 TALEN 技术可以发展成为一有效地制备基因工程小鼠的方法，证实了 MLKL 在程序性坏死中的核心作用，同时还为研究程序性坏死的生理学功能提供理想的小鼠模型。

关键词：基因工程小鼠； 转录样激活因子核酸酶； 坏死样凋亡； 混合系蛋白激酶样结构域蛋白

Abstract

Genetic engineering mice play important roles in the researches of life science, especially in elucidating the physiological function of genes. With the rapid development of genome sequencing, there emerges an increasing demand of genetic engineering mice. As the traditional strategy based on homologous recombination in cultured embryonic stem cells cannot meet the demands, the development of a new, rapid technique to get genetic engineering mice is of great urgency.

Transcription activator-like effector nucleases(TALENs) is a new genome editing technology developed in recent years, which can specifically edit any genome DNA sequence with high efficiency in cell lines. However, whether TALENs can be used to make genetic engineering mice is still unclear.

Necroptosis is a type of programmed necrosis which plays important roles in many physiopathological processes. Mixed lineage kinase domain-like protein(MLKL) was recently reported to be a key component in necroptosis. To confirm the indispensable role of MLKL in necroptosis and investigate the role of necroptosis in the pathophysiology of sepsis, we generated *Mkl* knockout mice through TALEN-mediated gene disruption and confirmed that MLKL is necessary for necroptosis. We also found that the blockade of necroptosis *in vivo* did not relieve the sepsis pathophysiology, which is not in consistent with what have been reported previously.

Our work proved that TALEN is powerful in generating genetic engineering mice, and established an ideal mice model to study the physiological function of necroptosis *in vivo*.

Key words: genetic engineering mice;TALEN;Necroptosis;MLKL

目录

摘要.....	1
Abstract	1
目录.....	2
TABLE OF CONTENT.....	6
第一章 前言	12
1.1 传统基因工程小鼠制备方法	12
1.1.1 实验小鼠发展历史.....	12
1.1.2 传统小鼠基因工程技术—基因打靶技术.....	13
1.1.3 传统基因打靶技术的发展--条件性基因敲除技术.....	15
1.1.4 其余传统基因工程小鼠制备方法.....	16
1.1.5 传统制备基因工程小鼠方法的不足.....	17
1.2 新型基因工程小鼠制备方法	18
1.2.1 利用转座因子系统制备基因工程小鼠.....	18
1.2.2 利用 RNA 干扰技术制备基因工程小鼠.....	19
1.2.3 利用锌指核糖核酸酶技术构建基因工程小鼠.....	19
1.2.4 新型基因工程小鼠制备方法的优势与不足.....	20
1.2.5 转录样激活因子核酸酶技术介绍.....	21
1.3 程序性坏死及其研究现状	22
1.3.1 细胞程序性坏死的研究历史.....	22
1.3.2 RIPK1 是细胞坏死过程中的关键激酶.....	23
1.3.3 RIPK3 是坏死样凋亡中 RIPK1 下游激酶.....	23
1.3.4 MLKL 是 RIPK3 的下游底物.....	24
1.3.5 程序性坏死的生理学意义.....	25
1.4 立题背景	25
第二章 实验材料与方法	28

2.1 实验材料	28
2.1.1 实验动物	28
2.1.2 细胞系	28
2.1.3 药品和试剂	28
2.1.4 抗体	29
2.2 实验室主要仪器	29
2.3 DNA 相关实验与方法	30
2.3.1 T4 DNA 连接酶构建 TALEN 质粒的方法;	30
2.3.2 DNA 连接产物及质粒的转化	30
2.3.3 质粒 DNA 的中量提取	30
2.3.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳	31
2.3.5 从琼脂糖凝胶中回收 DNA	31
2.3.6 连接酶非依赖性的克隆方法	32
2.3.7 细胞 RNA 样品的提取	32
2.3.8 逆转录 PCR 制备 cDNA	33
2.3.9 实时荧光定量 PCR	33
2.3.10 TALEN 质粒的酶切及体外转录	34
2.4 细胞相关实验及方法	35
2.4.1 细胞的获取及培养	35
2.4.1.1 细胞培养基及相关溶液配制	35
2.4.1.2 细胞的传代	36
2.4.2 细胞的转染以及电转	36
2.4.2.1 磷酸钙转染法	36
2.4.2.2 质粒的电转	37
2.4.3 腹腔巨噬细胞的分离和培养	37
2.4.4 骨髓细胞来源巨噬细胞的分离和培养	38
2.4.5 细胞药物刺激	38
2.4.6 利用流式细胞仪测定细胞存活率	38
2.4.7 利用 Mitotracker 观测 MEF 细胞坏死时线粒体的融合 (Fission) 情	

况.....	39
2.5 蛋白质相关实验和方法	40
2.5.1 免疫印迹.....	40
2.5.2 相关试剂配制.....	40
2.5.3 免疫共沉淀.....	41
2.5.4 细胞蛋白质样品的制备.....	42
2.5.5 组织蛋白样品的制备.....	42
2.5.6 免疫酶连法(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)测定样品 中的细胞因子的浓度.....	43
2.6 小鼠相关实验及方法	43
2.6.1 ICR 雄鼠的输精管结扎.....	43
2.6.2 C57BL6/J 小鼠受精卵的获得	44
2.6.3 显微注射.....	44
2.6.4 假孕鼠的获得及注射完受精卵的移植.....	44
2.6.5 小鼠尾部基因组提取及基因型鉴定.....	45
2.6.6 小鼠败血症模型的建立.....	46
2.6.6.1 盲肠结扎穿刺术引起败血症模型的建立.....	46
2.6.6.2 LPS 诱导内毒素血症模型的建立.....	46
2.6.7 雨蛙肽诱导小鼠急性胰腺炎模型的建立.....	46
2.6.8 小鼠血清的制备.....	46
2.6.9 小鼠组织切片的苏木素伊红染色分析.....	47
2.6.10 小鼠免疫细胞亚群的分析.....	47
2.6.10.1 细胞悬液的制备.....	47
2.6.10.2 免疫细胞的染色及流式分析.....	48
第三章 结果与讨论	49
3.1 利用 TALEN 技术制备 <i>Mkl</i> 基因工程小鼠	49
3.1.1 <i>Mkl</i> 基因特异性 TALEN 质粒的设计	49
3.1.2 <i>Mkl</i> 特异性 TALEN 功能的验证	49
3.1.3 TALEN 介导的 MLKL 基因突变 F0 代小鼠的鉴定	50

3.1.4 TALEN 可以用于高效地制备突变小鼠.....	51
3.1.5 部分突变小鼠为嵌合体小鼠.....	52
3.2 不同 <i>Mkl</i> 敲除小鼠株的建立与鉴定.....	52
3.2.1 不同 <i>Mkl</i> 敲除小鼠株的建立	52
3.2.2 <i>Mkl</i> 基因敲除小鼠的获得	53
3.2.3 利用 Western Blot 验证 <i>Mkl</i> 的敲除	54
3.3 <i>Mkl</i> 敲除小鼠的特性研究.....	55
3.3.1 MLKL 缺失不影响免疫系统的发育	55
3.3.2 MLKL 缺失对小鼠生理特征无明显影响	56
3.4 MLKL 对于 NF-κB 通路和 MAPK 通路的活化是非必须的	57
3.4.1 MLKL 对于胚胎成纤维细胞中 TNF- α 诱导的 NF- κ B 和 MAPK 通路的活化是非必须的.....	57
3.4.2 MLKL 不参与到 BMDM 细胞中 LPS 诱导的 NF- κ B 和 MAPK 通路的活化.....	58
3.5 MLKL 缺失对于细菌脂多糖诱导的炎症细胞因子表达无影响.....	59
3.5.1 MLKL 缺失对于 LPS 活化的 BMDMs 的炎症细胞因子表达无影响	59
3.5.2 小鼠在 LPS 刺激时炎症细胞因子的分泌不受 MLKL 调控	60
3.6 MLKL 是各种细胞程序性坏死所必须的	61
3.6.1 MLKL 是原代腹腔巨噬细胞程序性坏死所必须的	61
3.6.2 MLKL 是胚胎成纤维细胞程序性坏死过程所必须的	62
3.7 MLKL 缺失不影响坏死小体的形成，但是会阻滞线粒体融合的发生...63	63
3.7.1 MLKL 的缺失不会影响坏死小体的形成	63
3.7.2 MLKL 的缺失会延迟线粒体的融合	64
3.8 MLKL 是体内发生程序性坏死所必须的	65
3.8.1 MLKL 敲除抑制 TNF- α 诱导的系统性全身炎症反应	65
3.8.2 MLKL 缺失减轻雨蛙素诱导的急性胰腺炎病理	66
3.9 抑制程序性坏死不能减轻小鼠的败血症病理进程	67
3.9.1 小鼠中缺失 MLKL 的表达对 CLP 诱发的败血症无明显改善	68

3.9.2 小鼠中缺失 RIPK3 对 CLP 诱发的败血症病理无明显改善	68
第四章 总结与讨论	70
附录 1 图表索引	74
附录 2 缩略语及中英文对照	76
参考文献	80
致谢	89

TABLE OF CONTENT

TABLE OF CONTENT (IN CHINESE)	I
TABLE OF CONTENT (IN ENGLISH)	I
ABSTRACT (IN CHINESE)	2
ABSTRACT (IN ENGLISH)	7
CHAPTER 1 Introduction	12
1.1 Traditional methods of generating genetic engineering mice	12
1.1.1 History of experimental mice	12
1.1.2 Traditional methods of genetic generating engineering mice-gene targeting	13
1.1.3 Development of traditional gene targeting -condition knockout methods	15
1.1.4 Others methods of generating genetic engineering mice	16
1.1.5 The disadvantages of traditional methods	17
1.2 New methods of generating genetic engineering mice	18
1.2.1 Transposon systems in generating genetic engineering mice	18
1.2.2 RNAi in generating genetic engineering mice	19
1.2.3 ZFNs in generating genetic engineering mice	19
1.2.4 Advantages and disadvantages of the new developed methods	20
1.2.5 Introduction of TALENs	21
1.3 Programmed necrosis and research status	22
1.3.1 History of programmed necrosis	22
1.3.2 RIPK1 is the essential kinase of programmed necrosis	23
1.3.3 RIPK3 is the downstream kinase of RIPK1 during necroptosis	23
1.3.4 MLKL is the substrate of RIPK3	24
1.3.5 Physiological function of necroptosis	25
1.4 Background	25
CHAPTER 2 Materials and Methods	28

TABLE OF CONTENT

2.1 Materials	28
2.1.1 Animals	28
2.1.2 Mammalian cell lines	28
2.1.3 Drugs and reagents	28
2.1.4 Antibodies	29
2.2 Instruments	29
2.3 DNA relative methods	30
2.3.1 Construct TALEN plasmids through T4 DNA Ligase	30
2.3.2 Transformation of DNA into competent bacteria	30
2.3.3 Midi-prep of plasmid DNA	30
2.3.4 Agarose gel electrophoresis	31
2.3.5 Recovery of DNA from agarose gel	31
2.3.6 Ligase independent clone method	32
2.3.7 Isolation of total RNA from cells	32
2.3.8 Synthesis of cDNA by reverse transcription	33
2.3.9 Real-time PCR	33
2.3.10 Enzyme digestion and in vitro transcription of TALEN plasmids	34
2.4 Cell relative methods	35
2.4.1 Cell preparation and culture	35
2.4.1.1 Mediums and solutions	35
2.4.1.2 Cell culture and passage	36
2.4.2 Cell transfection	36
2.4.2.1 Calcium phosphate transfection	36
2.4.2.2 Electrophoretic transfection	37
2.4.3 Isolation and culture of peritoneal macrophages	37
2.4.4 Isolation and culture of BMDMs	38
2.4.5 Drug stimulation	38
2.4.6 Cell death assay by flow cytometer	38
2.4.7 Observation of mitochondria fission in necroptotic MEFs by Mitotracker	39
2.5 Protein relative methods	40

TABLE OF CONTENT

2.5.1 Western blot	40
2.5.2 Preparation of solutions	40
2.5.3 Immunoprecipitation (IP)	41
2.5.4 Sample preparation of cells	42
2.5.5 Sample preparation of tissues	42
2.5.6 Measurement of cytokines concentrations by ELISA	43
2.6 Mice related technologies	43
2.6.1 Vautomotive service engineersctomy in male ICR mice	43
2.6.2 Obtain zygotes from C57BL/6 mice	44
2.6.3 Microinjection	44
2.6.4 Obtain pseudopregnancy female mice and embryo transplantation	44
2.6.5 Extraction of genome DNA and genotyping	45
2.6.6 Mouse models of spesis	46
2.6.6.1 Sepsis induced by ceal ligation and puncture	46
2.6.6.2 LPS-induced endotoxemia	46
2.6.7 Mouse models of cerulein induced acute pancreatitis	46
2.6.8 Preparation of mice serums	46
2.6.9 Histological section and haematoxylin-eosin staining	47
2.6.10 Analysis of immune cells subgroup	47
2.6.10.1 Preparation of cell suspension	47
2.6.10.2 Staining of immune cells and analysis by flow cytometer	48
CHAPTER 3 Results and Discussion	49
3.1 Generation of <i>Mkl</i> mutant mice by TALENs	49
3.1.1 Design specific TALENs plasmids targeting <i>Mkl</i>	49
3.1.2 Verify the function of designed TALENs plasmids	49
3.1.3 Identify the mutant mice in F0 generation	50
3.1.4 TALENs can be used in generating mutant mice in high efficiency	51
3.1.5 Several mutant mice are chimeric mice	52
3.2 Indentify and establish different lines of <i>Mkl</i> knock-out mice	52

TABLE OF CONTENT

3.2.1 Establish different lines of <i>Mkl</i> knock-out mice	52
3.2.2 Generation of <i>Mkl</i> knock-out mice	53
3.2.3 Verify the knock-out of <i>Mkl</i> by western blot	54
3.3 Characteristics of <i>Mkl</i> knock-out mice	55
3.3.1 MLKL deficiency does not affect the development of immune system	55
3.3.2 MLKL deficiency dose not affect the physiological activities of mice	56
3.4 MLKL is not necessary for activation of NF-κ B and MAPK pathways	57
3.4.1 MLKL is not necessary for TNF induced NF- κ B and MAPK pathways activation in MEFs	57
3.4.2 MLKL is not involved in LPS induced NF- κ B and MAPK pathways activation in BMDMs	58
3.5 MLKL deficiency does not influence LPS induced inflammatory cytokines expression	59
3.5.1 MLKL deficiency does not influence LPS induced inflammatory cytokines expression in BMDMs	59
3.5.2 MLKL deficiency does not influence LPS induced inflammatory cytokines expression in mice	60
3.6 MLKL is necessary for necroptosis	61
3.6.1 MLKL is necessary for necroptosis in peritoneal macrophages	61
3.6.2 MLKL is necessary for necroptosis in MEFs	62
3.7 Deficiency of MLKL does not affect the formation of necrosome, but delays the mitochondria fission in necroptosis	63
3.7.1 MLKL deficiency does not affect the formation of necrosome in necroptosis	63
3.7.2 MLKL deficiency delays the mitochondria fission in necroptosis	64
3.8 MLKL is necessary for necroptosis <i>in vivo</i>	65
3.8.1 MLKL deficiency protects mice from TNF- α induced lethal systemic inflammatory response syndrome	65
3.8.2 MLKL deficiency decreases pathology and necrotic acinar cell death in cerulein-induced acute pancreatitis.	66

TABLE OF CONTENT

3.9 Blockade of necroptosis <i>in vivo</i> did not relieve the sepsis pathophysiology	67
3.9.1 MLKL deficiency doesn't protect mice against CLP-mediated polymicrobial septic shock.	68
3.9.2 RIPK3 deficiency doesn't protect mice against CLP-mediated polymicrobial septic shock.	68
CHAPTER 4 Results and Discussion	70
Appendix 1 LIST OF FIGURES AND TABLES	74
Appendix2 ABBREVIATIONS	76
REFERENCES	80
ACKNOWLEDGEMENTS	90

第一章 前言

1.1 传统基因工程小鼠制备方法

1.1.1 实验小鼠发展历史

实验动物在生命科学研究中起着不可替代的作用,对实验动物的使用最早可以追溯到公元前 384 年左右。目前常用的使用动物包括秀丽新小杆线虫、小鼠、大鼠、斑马鱼、果蝇、恒河猴等。小鼠由于具有体型小、抗感染性强、繁殖周期短、产仔数较多的特点,被广泛应用于生命科学研究。自 20 世纪初小鼠开始被应用于基因与毛色控制的关系的研究开始,基于实验小鼠研究所积累的知识已远远多余其他哺乳动物,也包括人类自己。

美国科学家 William E.Castle、英国科学家 J.B.S Haldane 和美国科学家 Abbie E.C.Lathrop 被公认为是近代实验小鼠遗传学的奠基人。其中 Castle 在担任哈佛大学 Bussey 实验生物动物学研究所主任期间,不仅在实验小鼠中证明了高等哺乳动物中孟德尔遗传定律的正确性,还积极鼓励针对各种实验动物的遗传学研究,对哺乳动物遗传学的发展产生了积极深远的影响^[1]。而 Haldane 则利用收集到的多株突变体小鼠,在高等哺乳动物体内首次证明了遗传连锁现象^[2],并利用各种实验小鼠积极开展遗传与自然选择的数学模型研究。Lathrop 于 1900 年在马萨诸塞州建立了著名的格兰贝小鼠农场,并从世界各地获取和引进各种突变体小鼠,其中就包括著名的“华尔兹小鼠”。在格兰贝小鼠农场,不同品系的小鼠被广泛杂交,现今许多自交品系小鼠即来自于 Lathrop 当年维持的小鼠品系后代^[3]。

随着实验小鼠在生命科学研究中的应用越来越广泛,对其进行规范的系统分类成为了领域发展的迫切需求。随之而来的自交品系的建立成为了小鼠遗传学发展史上最重要的事件,其对癌症、免疫学等生命科学领域的研究带来了革命性的影响。在此过程中, Castle 的学生 Clarence C.Little 创立了世界著名的 Jackson 实验室,并将其发展成为世界上最大最有影响的实验小鼠资源库,这也是世界上第一个将自交系在严格的繁殖及卫生监测下进行维持的实验室,这些小鼠相关操作都成为整个行业的金标准^[4]。DBA 小鼠是第一个建立的小鼠自交品系,而从格

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库